



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC 5512 – ESTÁGIO II

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE INTERAÇÃO COM O
DNA DE NOVOS COMPLEXOS DE COBRE(II) COM O LIGANTE
“DPPZ”**

Acadêmico: Everton de Britto Policarpi
Orientador: Adailton João Bortoluzzi

Florianópolis, novembro de 2008.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC 5512 – ESTÁGIO II

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE INTERAÇÃO COM O
DNA DE NOVOS COMPLEXOS DE COBRE(II) COM O LIGANTE
“DPPZ”**

Everton de Britto Policarpi

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Química, Centro de Ciências Físicas e
Matemáticas da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharel em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi

Florianópolis, novembro de 2008.

Dedico este trabalho a
Marlene de Britto Policarpi
e Amílcar Policarpi.

Agradecimentos

À Natureza, por todas as coisas que dela desfrutamos.

A minha família, sobretudo ao “grande” pai Amílcar e à sempre atenciosa mãe Marlene. Obrigado por tudo, desde aquele trocadinho para pegar o ônibus até aquele conselho que muito me ajudou.

A imensa família Policarpi e a grande família Britto que sempre me acolheram. Àqueles que aí estão e aos que não estão mais.

Abraço especial ao professor Adailton Bortoluzzi e a galera da B7: Geovana e Sara. E a todo o pessoal do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia - LABINC.

Aos professores daqui da UFSC e dos colégios por onde passei que cumpriram seu papel de *professor* com honradez e comprometimento.

À toda à galera da “fraude” (amigões): Latino, Panda, Vitinho, Geovanni, Daniel, Clitinho, Neto, Leko, Robgol, Xaxim, Natália, Vicente, Maressa, Santista. À galera do futeba, do C.A., da zoação em geral... Todos estes que citei e a outros que aqui não mencionei, fica o abraço de amizade.

Abraço mais do que merecido ao grande amigo Ivan, sem o qual esta realização não teria sido possível.

A Secretaria de Educação de Garopaba e Paulo Lopes pelo ônibus, que eu pegava todos os dias durante os dois primeiros anos de faculdade.

Abraço pra galera do Cursinho Comunitário.

Agradecimento ao pessoal do LACFI pela utilização do aparelho de infravermelho sempre que precisei. E ao Ismael do POLISSOL pela utilização e ajuda no equipamento de fluorescência.

Ao Departamento de Química da UFSC e aos professores que me inspiraram e colaboraram para o meu crescimento, e ao CNPq pela bolsa concedida durante este tempo. Obrigado pelo suporte.

*Como dois e dois são quatro
Sei que a vida vale a pena
Embora o pão seja caro
E a liberdade pequena...
Ferreira Gullar*

*Ser feliz sem motivo é a mais autêntica forma de felicidade
Carlos Drummond de Andrade*

Índice

Índice	06
Lista de Figuras.....	08
Lista de Tabelas.....	10
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	11
Resumo.....	12
1 – Introdução.....	13
1.1 – Química Bioinorgânica.....	13
1.2 – Ácido Desoxirribonucléico – DNA.....	13
1.3 – Interações Reversíveis com o DNA.....	16
1.4 – Clivagem do DNA.....	19
1.5 – Ligantes Derivados da 1,10-fenantrolina.....	20
2 – Objetivos.....	22
3 – Materiais e Métodos.....	22
3.1 – Materiais.....	22
3.2 – Métodos e Instrumentação.....	23
3.2.1 - Espectroscopia no Infravermelho – IV.....	23
3.2.2 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear - RMN ^1H	23
3.2.3 - Espectroscopia Eletrônica – UV-Vis.....	23
3.2.4 - Difratometria de Raios X.....	24
3.2.5 – Ensaio de Fluorescência.....	24
3.3 - Síntese Orgânica.....	24
3.3.1 - Síntese do <i>N</i> -bis-(2-piridilmetil) amina – bpma.....	24
3.3.2 - Síntese da 1,10-fenantrolina-5,6-diona – qphen.....	26
3.3.3 - Síntese do dipirido[3,2-A:2',3'-C]fenazina monohidratado – dppz.....	27
3.4 - Síntese Inorgânica.....	29
3.4.1 - Síntese do Complexo 1 - $[\text{Cu}(\text{bpma})\text{dppz}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 0,67\text{H}_2\text{O}$	29
3.4.2 - Síntese do Complexo 2 - $[\text{Cu}(\text{acac})\text{dppz}](\text{ClO}_4)$	30
4 - Resultados e Discussão.....	31
4.1 – Espectroscopia no Infravermelho.....	31

4.2 - Espectroscopia Eletrônica – UV-Vis.....	31
4.3 – Estruturas Cristalinas.....	34
4.3.1 - Estrutura Cristalina do $[\text{Cu}(\text{bpma})\text{dppz}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 0,67\text{H}_2\text{O}$	34
4.3.2 - Estrutura Cristalina do $[\text{Cu}(\text{acac})\text{dppz}](\text{ClO}_4)$	37
4.4 – Ensaios de Fluorescência.....	39
4.5 – Titulação Espectrofotométrica com o DNA.....	40
5 – Conclusões.....	43
6 – Referências Bibliográficas.....	44

Lista de Figuras

Figura 1 - Estruturas do DNA: (A) Estrutura do DNA proposta por Watson e Crick (B) Estrutura do DNA modelada por computador.....	14
Figura 2 - Representação das estruturas do B, A e Z-DNA.....	14
Figura 3 – Sulcos maior e menor da estrutura do B-DNA.....	15
Figura 4: Três modos de interação de complexos metálicos com o DNA.....	17
Figura 5 – As estruturas do brometo de etídio e acridina laranja, agentes intercalantes, e seu efeito sobre a estrutura do B-DNA.....	18
Figura 6 - Estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{1,10fenantrolina})_2]^+$	20
Figura 7 – Estrutura dos ligantes: (a) dppz e (b) dpq.....	21
Figura 8 - Os enantiômeros do $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$	21
Figura 9: Rota de síntese do ligante bpma.....	25
Figura 10: Espectro de RMN ^1H do bpma em CDCl_3	25
Figura 11: Espectro no IV do bpma em pastilha de KBr.....	26
Figura 12: Rota de síntese do qphen.....	26
Figura 13: Espectro de IV da qphen.....	27
Figura 14: Rota de síntese do dppz.....	27
Figura 15: Espectro de IV do dppz.....	28
Figura 16: Espectro de RMN ^1H do dppz.....	28
Figura 17: Espectro de IV do complexo 1	29
Figura 18: Espectro de IV do complexo 2	30
Figura 19: Espectros eletrônicos UV-Vis para os complexos 1 e 2	33
Figura 20: Estrutura cristalina resolvida do complexo $[\text{Cu}(\text{bpma})\text{dppz}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 0,67\text{H}_2\text{O}$	35
Figura 21: Estrutura cristalina resolvida do complexo $[\text{Cu}(\text{acac})\text{dppz}](\text{ClO}_4)$	37
Figura 22 – Espectros de fluorescência do complexo 1 em CH_3CN	40
Figura 23: a) Espectro eletrônico do complexo 1 na ausência e na presença de quantidades equivalentes de CT-DNA. b) Gráfico de $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F) \times [\text{DNA}]$ do complexo 1	41

Figura 24: **a)** Espectro eletrônico do complexo **2** na ausência e na presença de quantidades equivalentes de CT-DNA. **b)** Gráfico de $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F) \times [\text{DNA}]$ do complexo **2**.....42

Lista de tabelas

Tabela 1 - Dados de espectroscopia eletrônica para os complexos 1 e 2	34
Tabela 2. Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação para o complexo [Cu(bpma)dppz](ClO ₄) ₂ ·0,67H ₂ O.....	36
Tabela 3. Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação para o complexo [Cu(acac)dppz](ClO ₄).....	38
Tabela 4 - Valores de K _b para o brometo de etídio e diferentes complexos metálicos.....	43

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

%T	Percentual de transmitância
ϵ	Coeficiente de absortividade molar
δ	Deformação angular (IV)
δ_H	Deslocamento químico do hidrogênio (RMN 1H)
ν	Frequência de vibração (IV)
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda, no máximo de absorção
acac	Acetilacetato
bpma	N-bis-(2-piridilmetil)amina
bpy	2,2'-bipiridina
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CT-DNA	DNA Calf-Thymus
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dppz	Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina monohidratado
dpq	Dipirido[3,2-f:2',3'-h]quinoxalina
IV	Espectroscopia na região do Infravermelho
K_b	Constante de ligação intrínseca
P.F.	Ponto de fusão
phen	1,10-fenantrolina
qphen	1,10-fenantrolina-5,6-quinona monohidratada
RMN 1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
TMS	Tetrametilsilano
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UV-Vis	Espectroscopia na região do ultravioleta visível

Resumo

A partir da compreensão mais detalhada de como os sítios do DNA são atingidos com especificidade poderá levar a obtenção de novos fármacos e ao desenvolvimento de agentes diagnósticos altamente sensíveis. Para tal, procura-se sintetizar metalointercaladores, os quais podem ser complexos metálicos com ligantes que tenham uma função heterocíclica aromática planar, capaz de se inserir entre os pares de bases da dupla hélice do DNA. O estudo das interações metalointercaladores–DNA tem implicações na inibição da transcrição do DNA, o que pode impedir a replicação e crescimento de células.

Neste trabalho apresenta-se a síntese e caracterização através das técnicas de espectroscopia IV, espectroscopia UV-Vis e difratometria de raios X de dois novos complexos de Cu(II) com os ligantes dppz (dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina), bpma (N-bis-(2-piridilmetil)amina) e acac (acetilacetato). A atividade fluorescente do complexo **1** foi avaliada. Os complexos **1** e **2** apresentaram características para atuar como metalointercaladores possuindo valores de K_b , obtidos através da titulação espectrofotométrica com o CT-DNA, de $1,44 \cdot 10^5$ e $9,55 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ respectivamente, o que demonstra boa interação destes compostos com o DNA quando comparados com outros complexos.

1 - Introdução

1.1 – Química Bioinorgânica

A química bioinorgânica é um ramo da ciência, com abrangência multi e interdisciplinar, que envolve diversas áreas tais como química inorgânica, biologia, bioquímica, medicina, entre outras. Tem como principal objetivo, estudar as substâncias inorgânicas que ocorrem naturalmente em organismos vivos, como forma de elucidar a estrutura e função, incluindo aspectos nutricionais, de toxicidade, de transporte e estocagem. A química bioinorgânica está intimamente associada com a investigação da reatividade química dos íons metálicos nos sistemas biológicos, uma vez que estas substâncias são essenciais aos processos ocorridos nos organismos vivos, incluindo entre outros a respiração celular, em várias rotas metabólicas e na proteção contra agentes mutagênicos e tóxicos.¹

No âmbito farmacológico, tem-se a química inorgânica medicinal, que tem existido como uma área da ciência há cerca de trinta anos, desde a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina, *cis* [Pt(NH₃)₂Cl₂]. Entretanto há 3000 anos a.C. os egípcios já usavam cobre para esterilizar a água.²

1.2 – Ácido desoxirribonucléico - DNA

Há pouco mais de meio século foi proposta a estrutura em dupla hélice, aceita até hoje, para a molécula de DNA, Figura 1.³

O DNA é composto por duas cadeias polinucleotídicas que se mantêm unidas através de ligações de hidrogênio entre as bases complementares (Purínicas - A (Adenina), Guanina (G) e Pirimidínicas - Citosina (C), Timina (T)) de cada fita, sempre ocorrendo o pareamento de uma adenina com uma timina e uma citosina com uma guanina. As cadeias estão em sentidos opostos, enroladas em torno de um eixo, formando a dupla hélice (também conhecida como β-hélice), que é a principal forma estudada do DNA (B-DNA). Esta forma clássica descrita por

Watson e Crick é a forma mais abundante encontrada na célula. Nesta conformação do DNA, a dupla hélice gira para a direita (é dextrorsa).

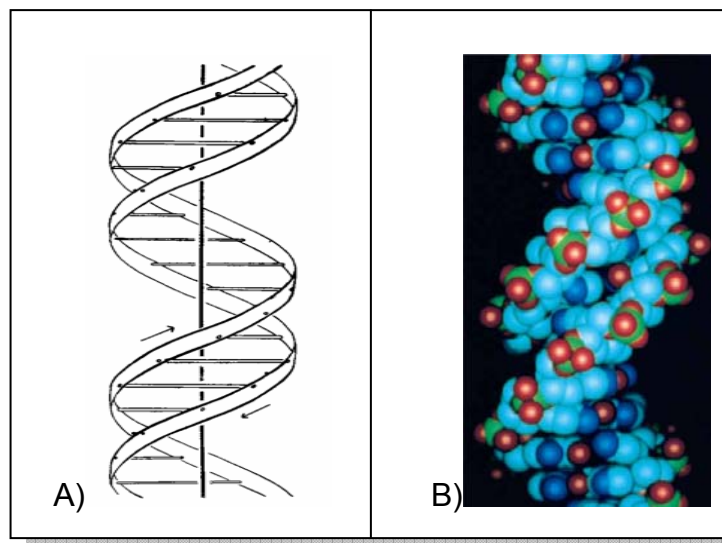


Figura 1 – Estruturas do DNA: (A) Estrutura do DNA proposta por Watson e Crick
³(B) Estrutura do DNA modelada por computador.⁴

Porém em outras condições o DNA pode formar outras estruturas, como mostrado na figura abaixo.⁵ Essas formas são conhecidas como A-DNA e Z-DNA, sendo que esta última gira no sentido contrário (é sinistrorsa) em relação as formas A e B, que são dextrorsas.

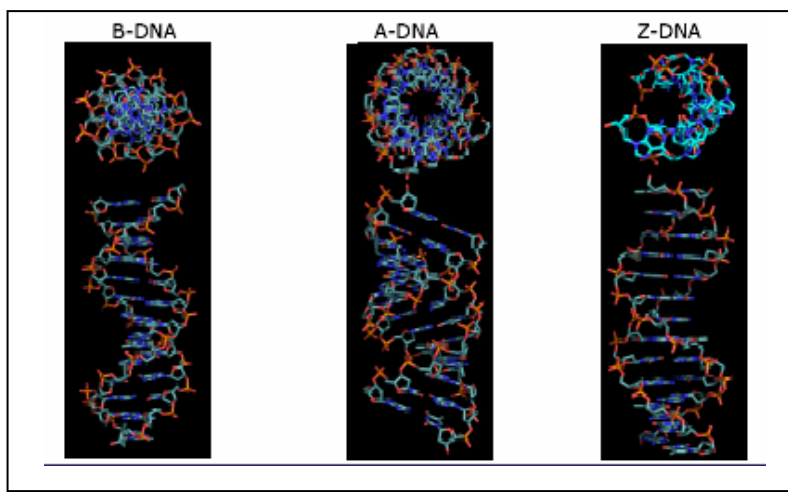


Figura 2 - Representação das estruturas do B, A e Z-DNA. (Figura extraída do site http://www.cbiot.ufrgs.br/bioinfo/LASSBio_2.pdf, acessado em 22/10/2008).

No B-DNA, os pares de base estão localizados no eixo da hélice e, por sua vez, as bases estão empilhadas predominantemente acima das bases vizinhas na mesma fita e perpendiculares ao eixo da hélice. As conformações do anel de ribose são C2'-*endo* e a ligação glicosídica *anti*. Em razão das características estruturais dos nucleotídeos e da dupla hélice do DNA, são formados sulcos na estrutura do B-DNA que, apesar de possuírem profundidades similares, possuem larguras distintas e, desta forma, são denominados sulco maior e sulco menor.⁵

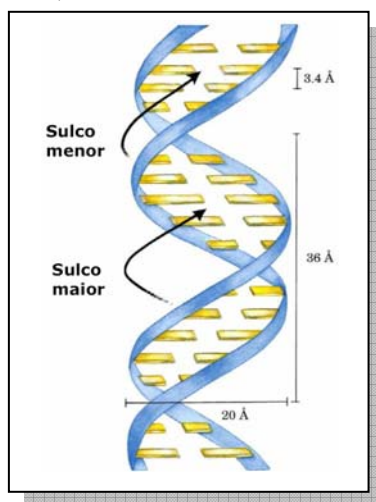


Figura 3 – Sulcos maior e menor da estrutura do B-DNA. (Figura extraída do site http://www2.iq.usp.br/docente/verjo/Estrutura_Funcao_Acidos_Nucleicos_2008.pdf, acessado em 18/10/2008).

Em seu trabalho Watson e Crick ressaltam algumas propriedades químicas e bioquímicas resultantes da conformação proposta para o DNA: 1) “Como os fosfatos estão no exterior, cátions têm fácil acesso a eles” e 2) “Não fugiu da nossa atenção que o pareamento específico que nós postulamos, imediatamente sugere um possível mecanismo de cópia para o material genético”.³ Da primeira observação salienta-se que muitas proteínas que interagem com o DNA possuem um íon metálico na cavidade de interação, como a nuclease de estafilococos (Ca^{2+}) e nuclease S1 (Zn^{2+}).⁶

1.3 – Interações reversíveis com o DNA

É interessante observar como evoluíram os estudos envolvendo metais e “moléculas biológicas”. A atração das cargas opostas leva a uma interação dos metais (positivamente carregados) com espécies biológicas (em geral “negativamente” carregadas). Este é o mesmo princípio que rege, por exemplo, a afinidade de pequenas moléculas por espécies metálicas como o O_2 capturado pela hemoglobina e o transporte de elétrons pelos metais dentro de um sistema vivo. Logo, não é surpreendente que a evolução natural tenha incorporado muitos metais em suas funções essenciais.⁷

O DNA interage reversivelmente com uma ampla variedade de espécies químicas que incluem água, íons metálicos e seus complexos, pequenas moléculas orgânicas e proteínas.⁵ Estas interações têm uma grande importância para sua estrutura e função, primeiramente porque todas as conformações que a molécula de DNA assume são estabilizadas, e só são possíveis, por meio de interações reversíveis com água, íons metálicos e/ou cátions orgânicos. Pode-se dizer que os ácidos desoxirribonucléicos da dupla hélice podem interagir reversivelmente de quatro formas diferentes com as moléculas ou íons.⁵

- Interação eletrostática externa: interações geralmente não específicas e de origem eletrostática do ligante (água, íons metálicos), com grupos fosfatos carregados negativamente situados ao longo da parte exterior da hélice;

- Interação através dos sulcos: interações diretas do ligante (molécula) com os pares de bases, situados nos sulcos maiores ou menores dos ácidos nucleicos; têm-se como exemplos com atividade biológica comprovada as seguintes drogas aromáticas: Hoeschst 33258, Berenil, distamicina.

- Intercalação: interação do ligante, que são comumente moléculas planares e com anel aromático intercalando entre os pares de bases do DNA. Exemplos de drogas que atuam por intercalação são a proflavina, brometo de etídio, acridina laranja e a actinomicina D.⁴

- Ligações de hidrogênio: os ligantes se coordenam aos átomos de oxigênio do fosfato do DNA estabelecendo, assim, a interação.

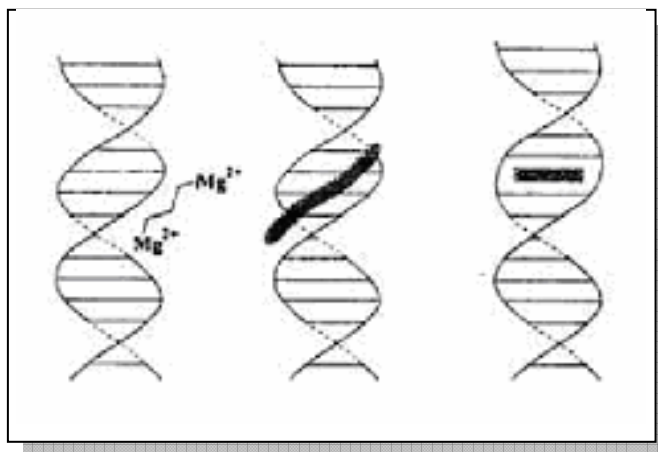


Figura 4: Três modos de interação de complexos metálicos com o DNA: a) interação eletrostática; b) interação através dos sulcos; c) intercalação.⁵

A primeira ocorre ao longo do exterior da dupla hélice do DNA através de interações que geralmente não são específicas e têm origem eletrostática. As interações através dos sulcos envolvem a interação direta do ligante com as bases nitrogenadas, tanto pelo sulco maior quanto pelo sulco menor. Estes sulcos diferem significativamente no potencial eletrostático, nas características das ligações de hidrogênio, nos efeitos estéreos e na hidratação.⁵

Barton cita que a maioria das pequenas moléculas se associa ao DNA através do sulco menor. Curiosamente a única característica dos metalointercaladores é a preferência pelo sulco maior da hélice.⁸

Os dois primeiros modos de interação não requerem mudanças conformacionais do DNA, mas podem induzir transições estruturais na formação do complexo. Já a intercalação requer mudanças nos ângulos torcionais da cadeia açúcar-fosfato para separação dos pares de bases adjacentes de uma distância (tipicamente perto de 3,4 Å) para permitir a inserção do sistema intercalante de anéis. Isto pode vir acompanhado por outras alterações na dupla hélice, como por exemplo, desnovelamento, dobramento, etc.⁵ Isto inibe tanto a transcrição como a replicação do DNA, causando toxicidade e mutações. Benzopireno, acridinas, aflatoxina e brometo de etídio são exemplos bem conhecidos de agentes intercalantes.⁹⁻¹¹

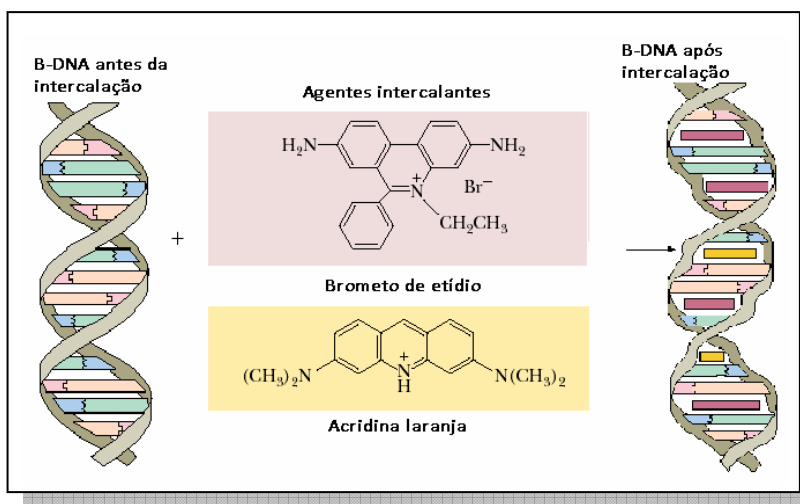


Figura 5 – As estruturas do brometo de etídio e acridina laranja, agentes intercalantes, e seu efeito sobre a estrutura do B-DNA.⁴

Vários estudos têm mostrado que existe uma correlação entre a capacidade do composto em se ligar ao DNA via um mecanismo de intercalação e sua predisposição a se auto-associar em solução via interações π - π . A afinidade de ligação de complexos metálicos com o DNA segue geralmente a seguinte ordem: intercalação > interação através dos sulcos > interação eletrostática.⁸

A intercalação constitui o único modo pelos quais os compostos aromáticos podem ser acomodados entre os pares de bases dos ácidos nucleicos. A principal característica de um intercalador é conter uma função heterocíclica aromática planar, capaz de se inserir entre os pares de bases da dupla hélice do DNA.

Os complexos metálicos com essa função são chamados metalintercaladores. Ao longo das últimas duas décadas, o estudo de metalintercaladores tem atraído substancial interesse, devido ao grande número de aplicações possíveis frente ao DNA.¹²

Lippard e colaboradores estabeleceram que complexos de Pt(II), quadrado-planar, contendo um ligante heterociclo poderiam se ligar ao DNA por intercalação, modificando sua arquitetura.^{13,14} Posteriormente, Barton e sua equipe estudaram a metalintercalação usando complexos octaédricos, justificando que aumentando a área superficial para o empilhamento intercalativo de um complexo aumenta sua afinidade de ligação intercalativa.⁸

Metalintercaladores sintéticos que possuem um ampliado ligante heterociclo aromático podem proporcionar úteis ferramentas na investigação do DNA, na forma de: sondas estruturais para o DNA, na forma de sensores eletroquímicos ou luminescentes (sensores de fluorescência, por exemplo), sondagens estruturais do RNA, reagentes fotoquímicos para o reparo de dímeros de timina, mediadores de reações de quebra do DNA e novos agentes terapêuticos como anticâncer e anti-protozoário, baseados no reconhecimento molecular, nas propriedades foto-físicas e eletroquímicas dos compostos intercaladores.^{8, 15}

O estudo das interações metalintercaladores–DNA vem se tornado cada vez mais importante, pois tem implicações na regulação de ativadores e repressores da expressão gênica *in vivo* e na inibição da transcrição, o que pode dificultar a replicação e crescimento de células cancerígenas.¹⁶ Estas moléculas são usadas em quimioterapia para inibir células câncerígenas com crescimento rápido.¹⁷

1.4 – Clivagem do DNA

O cobre 1,10-fenantrolina foi o primeiro complexo de coordenação que demonstrou ter uma atividade nucleolítica eficiente, tendo um mecanismo de clivagem oxidativo frente o DNA.¹⁸ Reagentes de clivagem oxidativa têm sido muito utilizados na técnica de “DNA Footprinting”, para definição de seqüências específicas de contato de DNA e proteínas, onde o agente de clivagem atua em toda a molécula de DNA. Acredita-se que o uso de ligantes semelhantes deve atuar de maneira análoga na clivagem do DNA.^{18, 19}

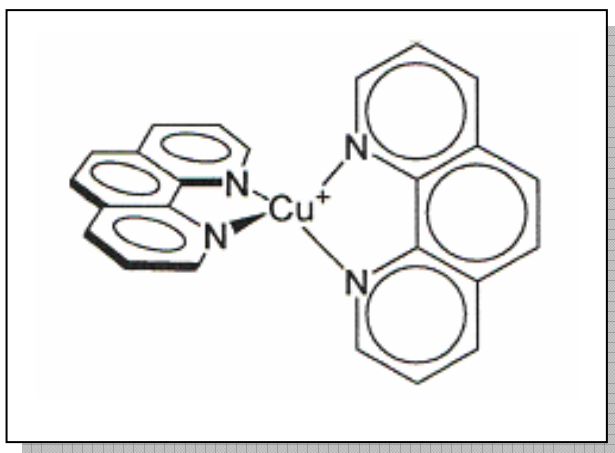


Figura 6 - Estrutura do complexo $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})_2]^+$.¹⁸

1.5 – Ligantes derivados da 1,10 - fenantrolina

A 1,10-fenantrolina-5,6-quinona realiza reações de condensação com diaminas aromáticas formando as respectivas dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina [dppz] e dipirido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalina [dpq].²⁰

Complexos que contém o ligante dipirido[3,2- *a*:2',3'-*c*]fenazina mostraram afinidades de ligação mais altas com o DNA do que outros complexos metálicos.²¹ Banard e colaboradores²² sintetizaram complexos $[\text{RuL}(\text{dpq})]^{2+}$ com L sendo um ligante de nitrogênio tetradentado não totalmente planar e obtiveram constantes de associação na ordem de $5,12 \cdot 10^4$ a $1,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Navarro e colaboradores²³ obtiveram as seguintes constantes de associação intrínsecas (K_b) para $[\text{Cu}(\text{dppz})\text{NO}_3]^+$, $[\text{Cu}(\text{dppz})_2\text{NO}_3]^+$, $[\text{Cu}(\text{dpq})\text{NO}_3]^+$ e $[\text{Cu}(\text{dpq})_2\text{NO}_3]^+$: $3,6 \cdot 10^4$, $8,1 \cdot 10^4$, $5,8 \cdot 10^4$ e $3,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente; esses compostos também apresentaram atividade leishmanicida.

Os complexos $[\text{Co}(\text{bipy})_2\text{dpq}]^{3+}$ e $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{dpq}]^{3+}$ têm se mostrado capaz de clivar o DNA plasmidial pBR322 depois de incubação e irradiação em 302 nm .²⁴

Chakravarty e colaboradores²⁵ reportaram o uso do ligante dppz complexado com Cu^{2+} como agente eficiente na clivagem do DNA em condições oxidativas e hidrolíticas com valor de K_b de $2,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Complexos de rutênio com fenantrolina contendo o ligante dppz se intercalam não especificamente na forma B do DNA, com uma pequena

preferência para regiões ricas em Adenina e Timina²⁶. Os complexos de dppz, com suas áreas superficiais aromáticas expandidas mostram uma afinidade extremamente alta com o DNA²⁷, $K_b > 10^6 \text{ M}^{-1}$. O ligante dppz possui propriedades interessantes como rigidez, estrutura aromática planar conjugada e habilidade de coordenação bidentada. Vários metais têm sido usados para a complexação destas moléculas nos quais se observa franca atividade de intercalação com o DNA, como exemplo pode ser citado o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ que possui alta afinidade com o DNA, mostrado na Figura 8.²⁸

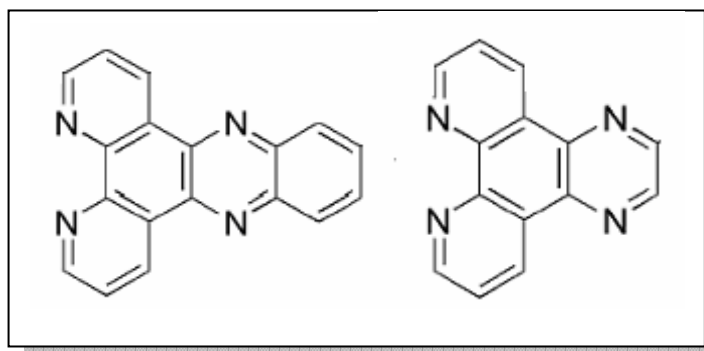


Figura 7 – Estrutura dos ligantes: (a) dppz e (b) dpq

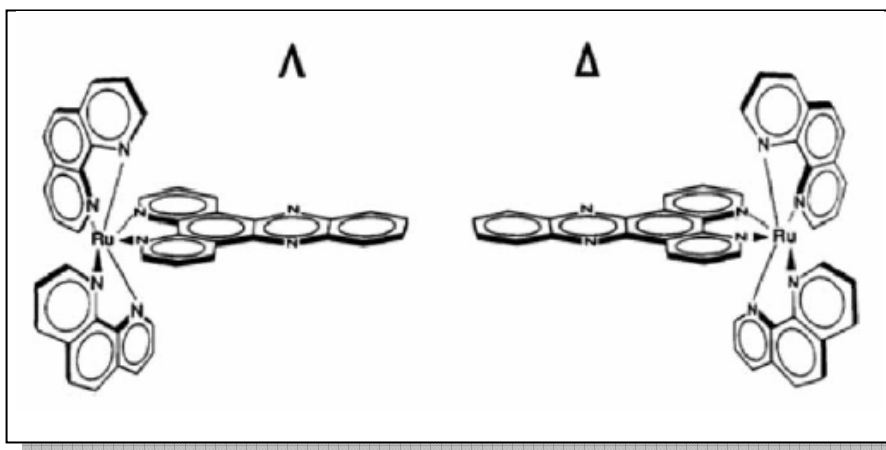


Figura 8 - Os enantiômeros do $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$, evidencia-se a planaridade do ligante dppz o qual tem a capacidade de intercalar-se no sulco maior do B-DNA.²⁸

Torna-se possível explorar as propriedades desses complexos metálicos (principalmente suas propriedades foto-físicas e redox) que podem ser utilizadas

no desenvolvimento de novos quimioterápicos e no desenvolvimento de agentes de diagnósticos altamente sensíveis.⁸

2 - Objetivos

Os objetivos do trabalho de conclusão de curso (TCC) constam dos seguintes itens:

- Síntese dos ligantes e precursores: 1,10-fenantrolina-5,6-quinona monohidratada (qphen), dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina monohidratado (dppz) e N-bis-(2-piridilmetil)amina (bpma);
- Síntese de complexos mononucleares de Cu(II) com os ligantes acima descritos e fazendo uso do ligante acetilacetato (acac);
- Caracterização dos ligantes e dos novos complexos por meio de diversas técnicas: espectroscopia de RMN ¹H, infravermelho e UV-Vis.
- Caracterização estrutural por meio de difração de raios X em monocristais.
- Testes de atividade através de técnicas de fluorimetria e titulações espectrofotométricas com o DNA.

3 – Materiais e métodos

3.1 - Materiais

Foram utilizados os seguintes reagentes de grau analítico de marcas nacionais (Nuclear e Vetec): 1,10-fenantrolina monohidratada, H₂SO₄, HNO₃, KBr, NaOH, NaHCO₃, CHCl₃, CH₂Cl₂, CH₃CN, EtOH, MeOH, éter etílico. Foi utilizado o reagente acetilacetona da marca Reagen. Os reagentes da marca Sigma-Aldrich: ortofenilenodiamina, etilenodiamina, 2-piridinacarboxialdeído, 2-(aminometil) piridina, hidróxido de lítio monohidratado, paládio/carbono 5%, perclorato de cobre (II) hexahidratado utilizados na preparação dos ligantes e dos complexos foram adquiridos de fonte comercial, com grau de pureza compatível com a utilização, sem prévia purificação. DNA de timo de bezerro (CT-DNA – “*Calf Thymus DNA*”)

foi adquirido da marca Sigma-Aldrich. Solvente CH_3CN e DMF de grau espectroscópico Mallinckrodt foi utilizado na caracterização dos complexos. Os gases N_2 , Ar e H_2 foram da marca White Martins. Os solventes deuterados CDCl_3 e DMSO-d_6 foram das marcas Aldrich e Acros, respectivamente.

3. 2 - Métodos e instrumentação

3.2.1 - Espectroscopia no infravermelho – IV

As amostras para análise foram preparadas na forma de discos de brometo de potássio (KBr) em grau espectroscópico prensados a vácuo (8 toneladas), formando pastilha com cerca de 1 cm de diâmetro e 0,5 mm de espessura. Estas pastilhas foram introduzidas diretamente no caminho óptico do equipamento para leitura do percentual de transmitância (%T). O aparelho usado foi um Varian 3100 FTIR, instalado no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LACFI) localizado no Departamento de Química/UFSC.

3.2.2 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio - RMN ^1H

O equipamento usado nos experimentos de RMN foi um Varian com frequência de 400 MHz. As amostras foram solubilizadas em 0,7 mL do solvente adequado contendo tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) como padrão interno e acondicionadas em tubo de 5mm. O equipamento se encontra na Central de Análises do Departamento de Química/UFSC.

3.2.3 - Espectroscopia eletrônica – UV-VIS

Os espectros eletrônicos dos complexos nas regiões do ultravioleta e visível foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer modelo Lambda-19, Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC), Departamento de Química – UFSC.

As análises foram realizadas em solventes de grau espectroscópico e cubetas de quartzo com um centímetro de caminho ótico.

3.2.4 - Difratometria de raios X

A análise por difratometria de raios X dos monocristais dos complexos $[\text{Cu}(\text{bpma})\text{dppz}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 0,67\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{acac})\text{dppz}](\text{ClO}_4)$ foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. Os dados foram coletados em um difratômetro Enraf-Nonius CAD – 4 equipado com um tubo de molibdênio ($\text{MoK}\alpha \lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite à temperatura de 293 K. A estrutura cristalina foi resolvida por métodos diretos com a utilização do programa SHELXS97 e refinadas pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa com a utilização do programa SHELXL97 (programas computacionais para solução e refinamento de estruturas cristalinas, respectivamente, desenvolvidos por G. M. Sheldrick na Universidade de Göttingen).

3.2.5 – Ensaios de fluorescência

Os espectros de fluorescência do complexo **1** foram obtidos em um fluorímetro de marca Hitachi modelo *F-4500 Fluorescence Spectrophotometer* no Laboratório de Polímeros e Surfactantes em Solução (POLISSOL), Departamento de Química – UFSC. As análises foram realizadas em solvente de grau espectroscópico e cubeta de quartzo com um centímetro de caminho ótico.

3.3 - Síntese orgânica

3.3.1 - Síntese do *N*-bis-(2-piridilmetil) amina – bpma

O ligante bpma foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito na literatura.²⁹ Foram obtidos 19,7 g do produto bpma, com rendimento de 98% em

relação ao reagente de partida 2-(aminometil) piridina (98 mmol; 199,26 g.mol⁻¹). O bpma foi caracterizado por RMN ¹H (Figura 10) e IV (Figura 11).

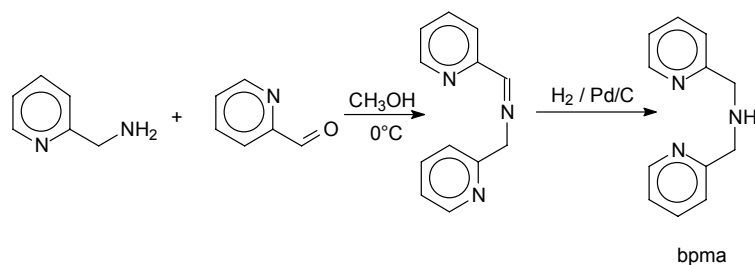


Figura 9: Rota de síntese do ligante bpma.

RMN ¹H - δ_H (400 MHz; CDCl₃), em ppm: 3,00 (s, 1 H, NH); 3,90 (s, 4 H, CH₂); 7,06-7,59 (dd, 6 H, CH_{ar}); 8,48 (d, 2 H, CH_{ar-py}).

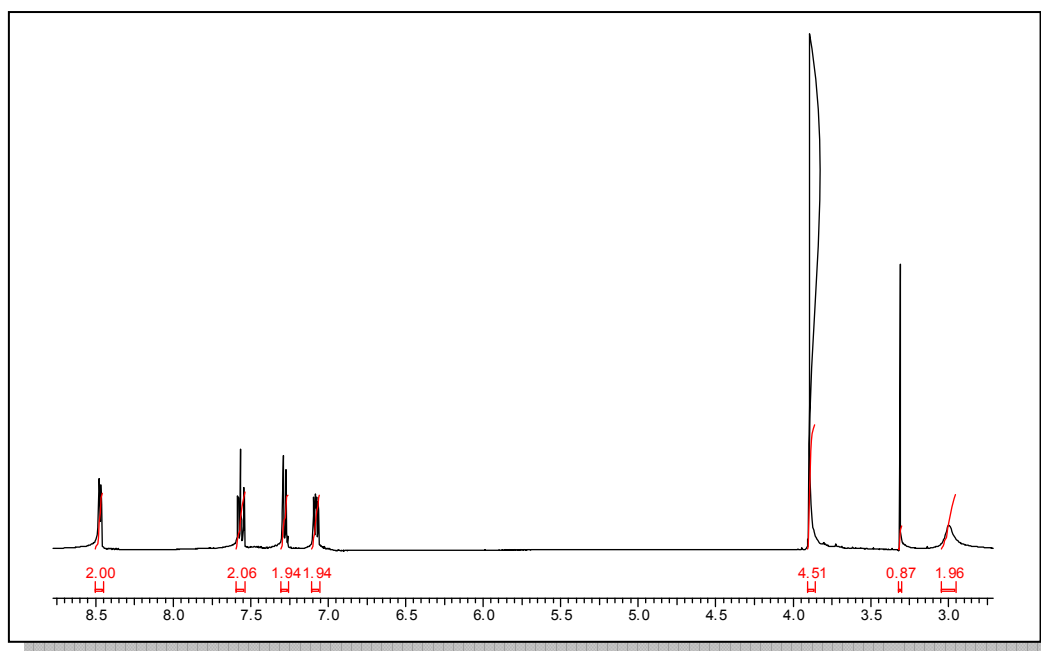


Figura 10: Espectro de RMN ¹H do bpma em CDCl₃.

IV (KBr) em cm⁻¹: ν (N-H) 3300; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3062-2828; ν (C=N e C=C) 1592-1434; ν (C-N) 1148; δ (C-H_{ar}) 758.

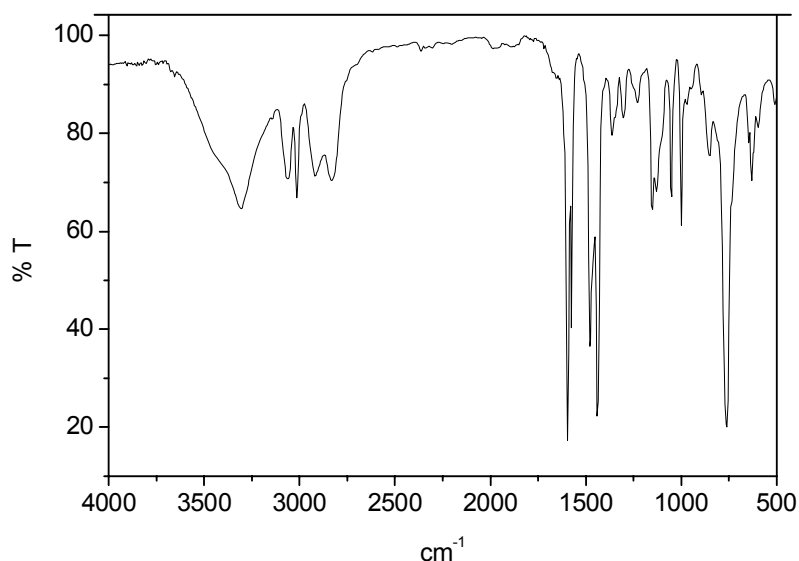


Figura 11: Espectro no IV do bpa em pastilha de KBr.

3.3.2 - Síntese da 1,10-fenantrolina-5,6-quinona - qphen

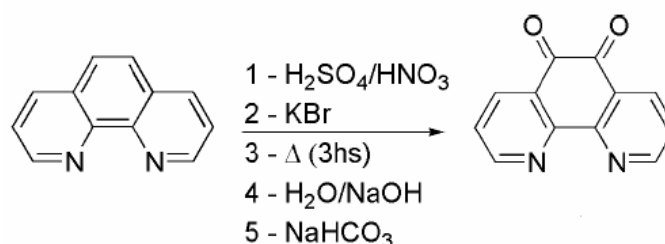


Figura 12: Rota de síntese do qphen

O ligante 1,10-fenantrolina-5,6-quinona monohidratada (qphen) foi sintetizado seguindo procedimento adaptado da literatura.³⁰ O rendimento foi de 90%. O composto foi caracterizado por IV (Figura 13) e RMN ^1H .

IV (KBr, cm^{-1}): ν (C-H_{ar}) 3084-2953; ν (C=O) 1685; δ (C-H_{ar}) 740. No infravermelho a banda intensa em 1685 cm^{-1} caracteriza a presença das carbonilas.

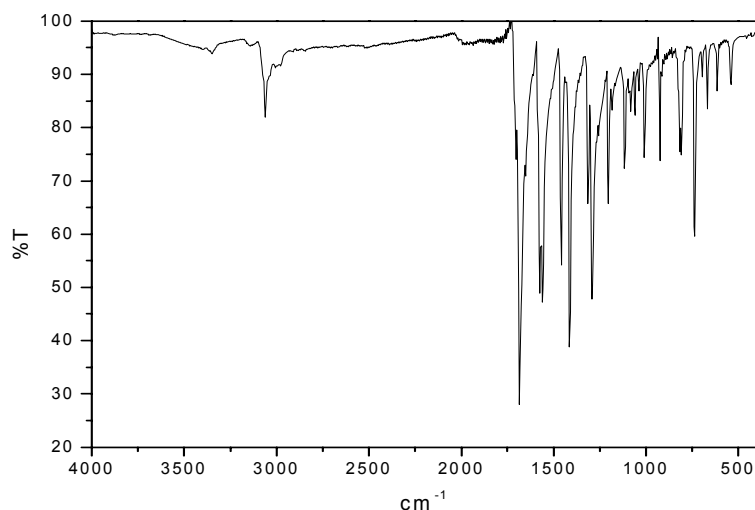


Figura 13: Espectro de IV do qphen em pastilha de KBr.

RMN ^1H (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7,66 (dd, 2H, CH_{ar}), 8,38 (dd, 2H, CH_{ar}), 8.97 (dd, 2H, CH_{ar}).

3.3.3 - Síntese do dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina monohidratado – dppz

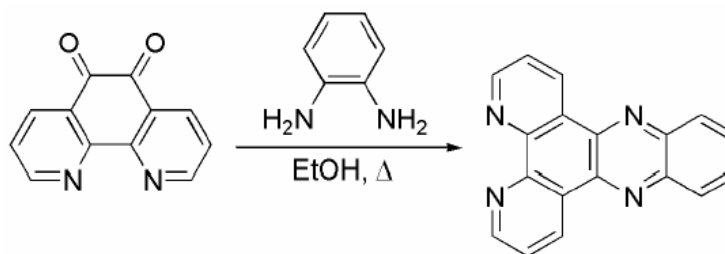


Figura 14: Rota de síntese do dppz

O dppz foi sintetizado adicionando lentamente 950 mg de ortofenilenodiamina (8,78 mmol) dissolvida em etanol a uma solução etanólica contendo 1,10-fenantrolina-5,6-diona (2 g; 8,76 mmol). A mistura foi aquecida a 60°C durante 20 minutos sob agitação, e após o resfriamento até temperatura ambiente houve formação de precipitado amarelo que foi filtrado e lavado com água e etanol gelado. Rendimento 85%. M_M : 300,31 g/mol.

P.F.: 252,9°C – 254,0 °C P.F.(liter.): 251-252 °C²²

IV(KBr, cm^{-1}): ν (O-H)_{água} 3415, (C-H_{ar}) 3148-2828; ν (C=N e C=C) 1637-1338; ν (C-N) 1073; δ (C-H_{ar}) 740.

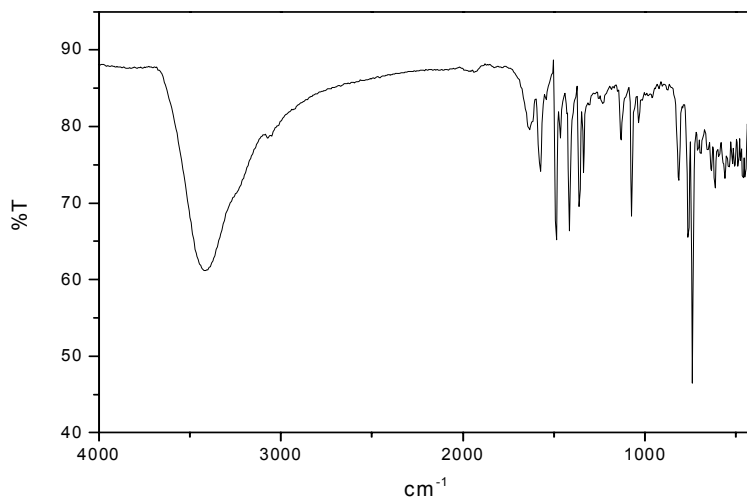


Figura 15: Espectro de IV do dppz em pastilha de KBr.

RMN ^1H (ppm, DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 7,94 (dd, 2H, CH_{ar}); 8,05 (dd, 2H, CH_{ar}); 8,38 (dd, 2H, CH_{ar}); 9,21 (dd, 2H, CH_{ar}); 9,53 (dd, 2H, CH_{ar}).

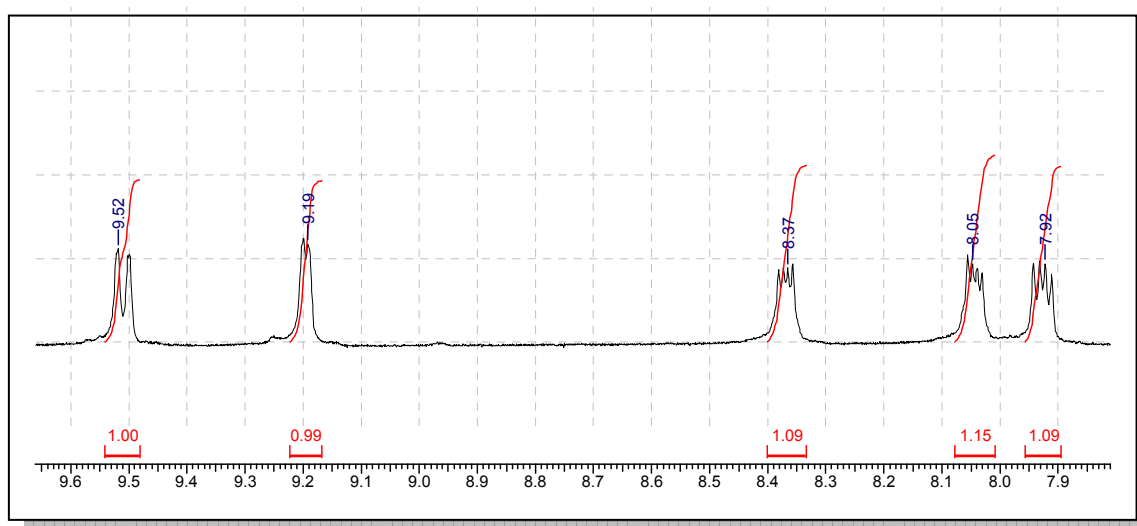


Figura 16: Espectro de RMN ^1H do dppz

3.4 - Síntese inorgânica

3.4.1 - Síntese do complexo 1 - $[\text{Cu}(\text{bpma})\text{dppz}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 0,67\text{H}_2\text{O}$

O complexo foi sintetizado adicionando-se os ligantes dppz (0,151g; 0,50 mmol) e bpma (0,101g; 0,5 mmol) a uma solução em acetonitrila (30 mL) do sal perclorato de cobre hexahidratado $[\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, (0,185g; 0,5 mmol) sob agitação e com leve aquecimento. No meio reacional, observou-se a formação de um precipitado gelatinoso azulado, o qual foi filtrado e separado. A solução filtrada, azul-marinho foi deixado em repouso. Após dez dias à temperatura ambiente, houve a formação de monocristais de coloração violeta adequados para a resolução da estrutura cristalina por difração de raios X, os quais foram lavados com etanol e éter etílico gelado. Rendimento 32% (0,121g; 754,1 g/mol; 0,16 mmol) baseado no sal de cobre. A Figura 17 apresenta o espectro de IV do complexo.

IV(KBr, cm^{-1}) do cristal: ν (N-H) 3493; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3132-2827; ν (C=N e C=C) 1612-1419; ν (ClO_4^-) 1091; δ (C-H_{ar}) 763 e 734; δ (ClO_4^-) 619.

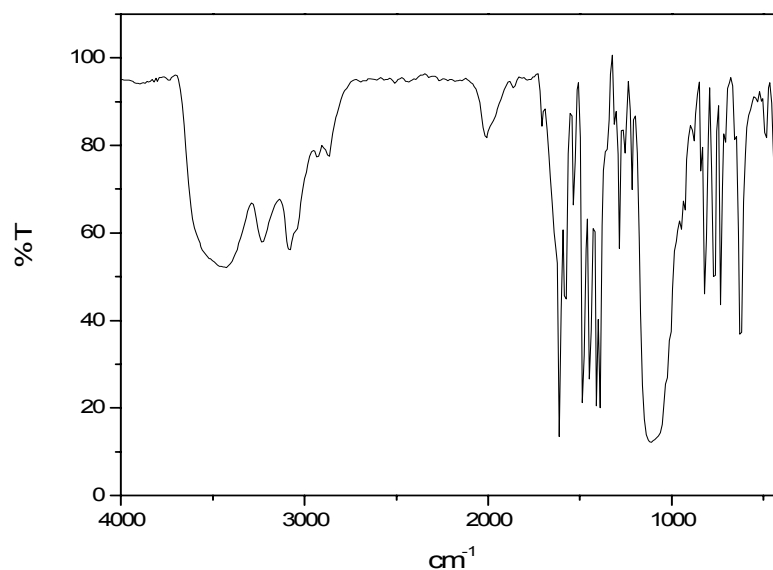


Figura 17: Espectro de IV do complexo 1 em pastilha de KBr.

3.4.2 - Síntese do complexo 2 - $[\text{Cu}(\text{acac})\text{dppz}](\text{ClO}_4)$

O complexo foi sintetizado adicionando-se os ligantes dppz (0,150g; 0,50 mmol) e acac (0,102g; 0,51 mmol) a uma solução em acetonitrila (30 mL) do sal perclorato de cobre hexahidratado $[\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, (0,186g; 0,5 mmol) sob agitação. Foi adicionado ao meio reacional hidróxido de lítio monohidratado $[\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}]$, (0,042 g; 1,0 mmol). Observou-se a formação de um precipitado esverdeado após alguns minutos da adição dos ligantes, o qual foi filtrado e separado. A solução filtrada azul-esverdeada escura foi deixada em repouso. Após cerca de cinco dias à temperatura ambiente, houve a formação de monocristais de coloração verde adequados para a resolução da estrutura cristalina por difração de raios X. Rendimento 40% (0,108 g; 544,40 g/mol; 0,20 mmol) baseado no ligante dppz. A Figura 18 apresenta o espectro de IV do complexo.

IV(KBr, cm^{-1}) do cristal: ν (O-H)_{água} 3436; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3122-2949; ν (C=O) 1574-1565; ν (C=C e C=N) 1521-1357; ν (ClO_4^-) 1092; δ (C-H_{ar}) 731 e δ (ClO_4^-) 620 cm^{-1} .

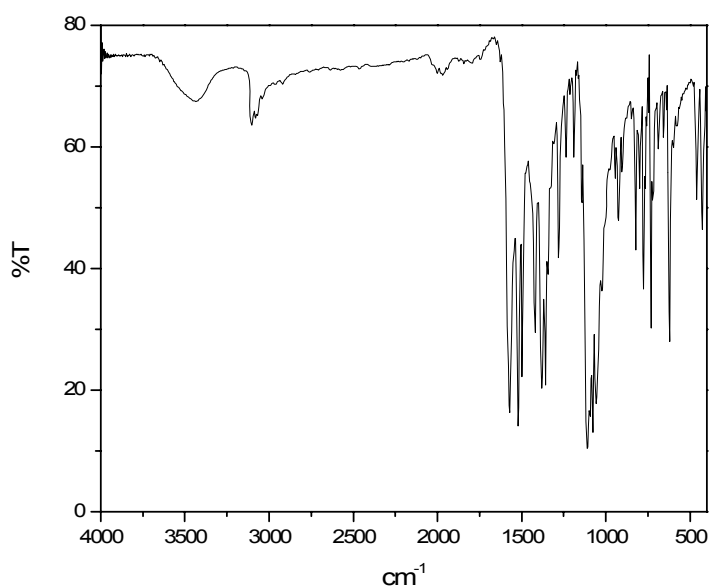


Figura 18: Espectro de IV do complexo 2 em pastilha de KBr.

4 - Resultados e discussão

4.1 – Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho foi utilizada com o intuito de fornecer informações preliminares a respeito da formação dos complexos, em virtude de ser uma técnica rápida, de baixo custo e que, na grande maioria das vezes, nos fornece informações importantes acerca do composto analisado. Destacam-se as informações referentes às diferenças quanto ao deslocamento e intensidade das bandas referentes aos grupos funcionais do ligante livre e do complexo, em virtude da coordenação da molécula do ligante aos metais utilizados. E também quanto ao aparecimento da banda do contra-íon utilizado.

Ambos os complexos, **1** e **2**, (Figuras 17 e 18) apresentam uma banda intensa referente ao contra-íon perclorato (ClO_4^-) com deslocamento do estiramento axial assimétrico por volta de 1080 cm^{-1} . Os compostos sintetizados apresentaram no infravermelho deslocamento das bandas referentes às dos ligantes livres, com as quais torna-se possível afirmar preliminarmente, que houve a formação dos complexos, correlacionando-se os espectros dos ligantes com os espectros dos complexos.

4.2 - Espectroscopia eletrônica – UV-VIS

A espectroscopia eletrônica dos complexos **1** e **2** foi feita em solução utilizando-se como solventes acetonitrila e dimetilformamida.

As propriedades eletrônicas do íon Cu(II) livre (d^9) são alteradas quando ele está submetido à influência de um campo ligante, o que faz com que os orbitais d sofram desdobramento em diferentes níveis de energia, sendo o desdobramento fortemente dependente da natureza dos ligantes e do ambiente de coordenação do centro metálico.³¹

Complexos de cobre(II) em ambiente octaédrico normalmente apresentam-se em estereoquímicas altamente distorcidas com alongamento das ligações em um dos eixos, distorção Jahn-Teller. Complexos de cobre(II) pentacoordenados podem assumir geometrias piramidal de base quadrada ou bipirâmide trigonal e os espectros eletrônicos mostram tipicamente uma banda de absorção mais intensa em mais alta energia e uma menos intensa em menor energia para geometria piramidal de base quadrada, enquanto que uma banda de absorção menos intensa em mais alta energia e uma mais intensa em menor energia para geometria bipirâmide trigonal.³²

Espectros de complexos de cobre(II) podem apresentar até três transições, que estão muitas vezes encobertas em uma única transição alargada centrada na região de 600-700 nm.³²

Os espectros eletrônicos do complexo **1** e do complexo **2**, apresentam uma banda bastante alargada centrada por volta de 620 nm típica de transições *d-d* do íon Cu(II) típica de uma geometria de coordenação octaédrica com moléculas de solvente ocupando as posições de coordenação lábeis, caracterizadas por baixos valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ).³¹

O complexo **1** possui duas geometrias de coordenação observadas de acordo com a resolução por difratometria de raios X (Figura 20) . Uma molécula de solvente pode ocupar uma posição lábil na estrutura com geometria de coordenação octaédrica distorcida substituindo a espécie perclorato, resultando na banda bastante alargada na região de 600-700 nm, a qual pode encobrir a banda referente à geometria de bipirâmide trigonal em solução, a qual deveria se desdobrar em duas bandas.

O complexo **2** apresenta comportamento “semelhante” na qual uma molécula de solvente deve ocupar uma posição de coordenação lábil na estrutura, resultando na banda alargada observada no espectro da Figura 19.2-a.

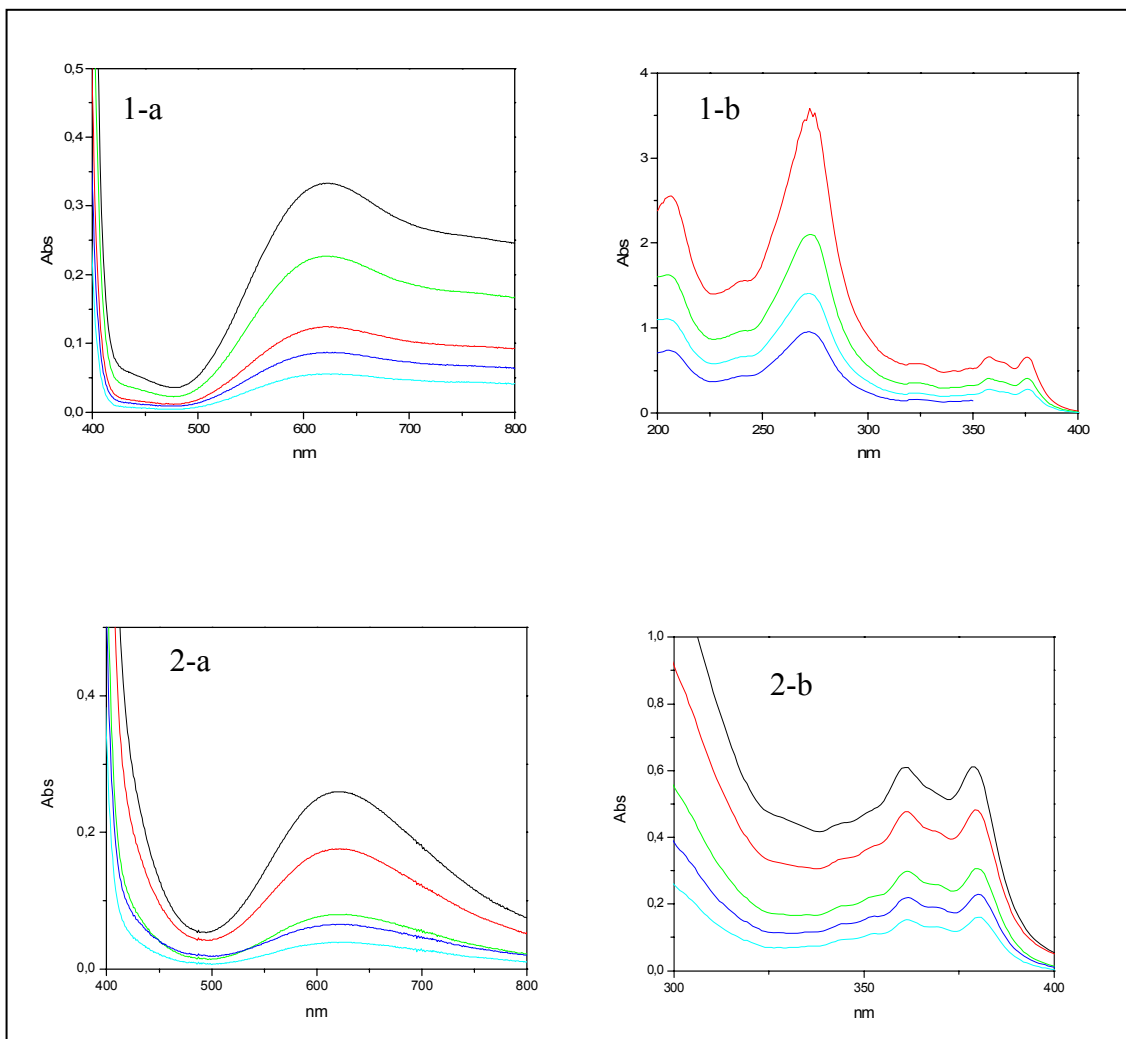


Figura 19: Espectros eletrônicos UV-Vis para os complexos **1** e **2** à temperatura ambiente: **1-a**) $[\text{CH}_3\text{CN}]$ (mol/L): $3,0 \times 10^{-3}$; $2,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-3}$; $7,5 \times 10^{-4}$; $5,0 \times 10^{-4}$; **1-b**) $[\text{CH}_3\text{CN}]$ (mol/L): $4,9 \times 10^{-5}$; $3,0 \times 10^{-5}$; $2,0 \times 10^{-5}$; $6,0 \times 10^{-6}$; **2-a**) $[\text{DMF}]$ (mol/L): $3,0 \times 10^{-3}$; $2,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-3}$; $7,5 \times 10^{-4}$; $5,0 \times 10^{-4}$; **2-b**) $[\text{DMF}]$ (mol/L) : $4,55 \times 10^{-5}$; $3,41 \times 10^{-5}$; $2,27 \times 10^{-5}$; $1,70 \times 10^{-6}$; $1,70 \times 10^{-6}$).

Os espectros das Figuras 19.1-b e 19.2-b evidenciam a presença de transições intra-ligantes abaixo dos 400 nm com valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) que variam na ordem de 10^2 - $25 \cdot 10^3 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Estas transições são referentes às possíveis transições intra-ligantes nos anéis aromáticos dos ligantes utilizados sobretudo nas moléculas do “dppz”. Devido à conjugação dos anéis, um elétron π é promovido do orbital molecular ocupado de

maior energia, ou HOMO, para o orbital molecular vazio de menor energia, ou LUMO. Como o elétron é promovido de um orbital molecular π ligante para um orbital molecular π^* antiligante, chamamos essa excitação de π - π^* . Outra transição possível é a promoção de um elétron num orbital não-ligante n para um orbital molecular π^* antiligante, chamada de transição n - π^* , também intra-ligante. Esses dois tipos de transição são possíveis de acordo com a estrutura do ligante, pois este possui elétrons π ligantes e n não-ligantes, passíveis de serem excitados.

Os espectros eletrônicos dos complexos de **1** e **2** apresentados na Figura 19 tem seus dados relativos resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de espectroscopia eletrônica para os complexos **1** e **2**.

Complexo	$\lambda_{\text{máx}}$ nm (ϵ ; L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
1*	621 (113); 376 (13207); 364 (11988); 358(13239); 320 (10069)
2*	620 (88,6); 379 (13511); 370 (12126); 362 (13703).

* Os valores de ϵ abaixo de 300 nm para os complexos não foram calculados.

4.3 – Estruturas cristalinas

As estruturas cristalinas dos complexos de cobre(II) foram resolvidas através da análise de monocristais pelo método de difração de raios X. Os cristais obtidos apresentaram boa estabilidade em condições ambientes.

4.3.1 - Estrutura cristalina do complexo [Cu(bpma)dppz](ClO₄)₂.0,67H₂O

O complexo **1** cristalizou na forma de monocristais violetas pertencentes ao sistema cristalino monoclinico, grupo espacial C2/c, e apresenta 12 unidades elementares na cela unitária. Uma visão tridimensional via ORTEP do complexo é apresentada na Figura 20.

A unidade assimétrica que compõe a cela unitária é composta basicamente por duas moléculas do complexo **1** com geometrias de coordenação distintas. Em

uma molécula (Figura 20-a) o Cu1 encontra-se em uma geometria de coordenação octaédrica distorcida. O centro metálico está coordenado a uma molécula de bpma N-doadora de forma tridentada e uma molécula do ligante bidentado dppz também N-doadora, além de uma molécula de ClO_4^- coordenada em uma posição apical com uma distância de ligação Cu1-O'6 de 2,779(16) Å.

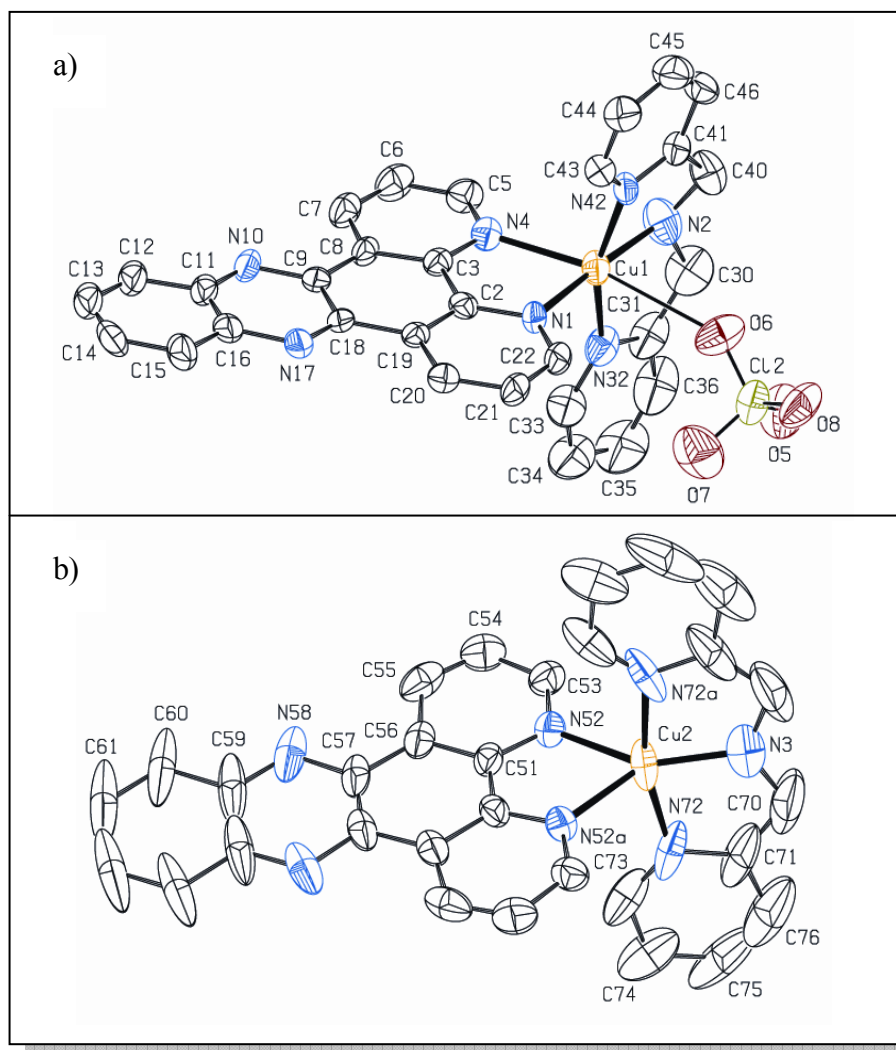
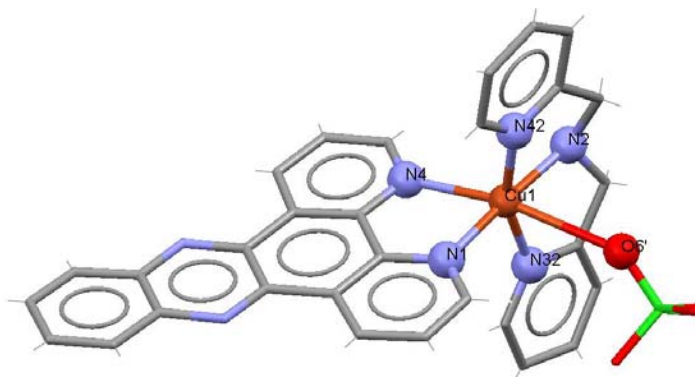


Figura 20: Estrutura cristalina ORTEP resolvida do complexo [Cu(bpma)dppz](ClO₄)₂·0,67H₂O: a) estrutura com uma molécula de ClO₄⁻ parcialmente coordenada; b) estrutura com geometria de coordenação bipirâmide trigonal distorcida.

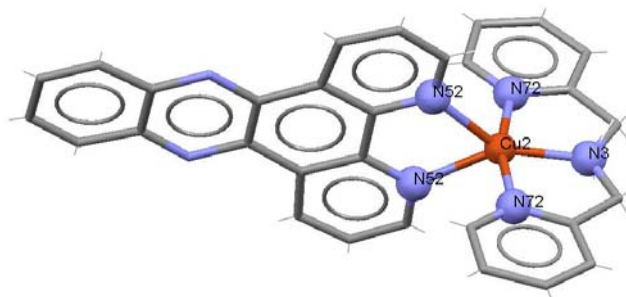
Na Tabela 2, estão os dados cristalográficos relevantes para o complexo 1.

Tabela 2. Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação para o complexo $[\text{Cu}(\text{bpma})\text{dppz}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 0,67\text{H}_2\text{O}$

Cu1-N32	1,989(9)
Cu1-N42	2,003(8)
Cu1-N2	2,013(9)
Cu1-N1	2,023(7)
Cu1-N4	2,266(7)
Cu1-O'6	2,779(16)
Cu2-N3	1,89(2)
Cu2-N72	2,003(14)
Cu2-N52	2,121(7)



N32-Cu1-N42	159,7(3)
N32-Cu1-N2	82,0(4)
N42-Cu1-N2	82,9(4)
N32-Cu1-N1	97,6(4)
N42-Cu1-N1	96,5(3)
N2-Cu1-N1	176,3(4)
N32-Cu1-N4	94,6(3)
N42-Cu1-N4	102,6(3)
N2-Cu1-N4	105,6(4)
N1-Cu1-N4	78,1(3)
N3-Cu2-N72	82,6(3)
N72-Cu2-N72#1	165,1(7)
N72-Cu2-N52#1	91,9(4)
N3-Cu2-N52	141,1(2)
N72-Cu2-N52	99,7(3)
N52#1-Cu2-N52	77,7(4)



Operação de simetria: #1 -x+1,y,-z+1/2

Na estrutura apresentada na Figura 20-b observa-se que o Cu2 está coordenado através de uma molécula de bpma de forma tridentada e uma molécula do ligante bidentado dppz, ambas N-doadoras. Formando neste caso, uma geometria de coordenação pirâmide de base quadrada distorcida, o que é confirmado empregando-se a equação descrita por Addison e colaboradores³³ obtendo-se um valor de $\tau = 0,40$. Observa-se neste caso a equivalência entre si dos átomos N-doadores tanto do dppz quanto os átomos de nitrogênio da piridina do ligante bpma. É ressaltada a planaridade do ligante dppz, característica importante para a intercalação no DNA.

4.3.2 - Estrutura cristalina do complexo [Cu(acac)dppz](ClO₄)

O complexo **2** cristalizou na forma de monocristais verdes pertencentes ao sistema cristalino monoclinico, grupo espacial $P2_1/c$, e apresenta 4 unidades elementares na cela unitária. Uma visão tridimensional via ORTEP do complexo é apresentada na Figura 21.

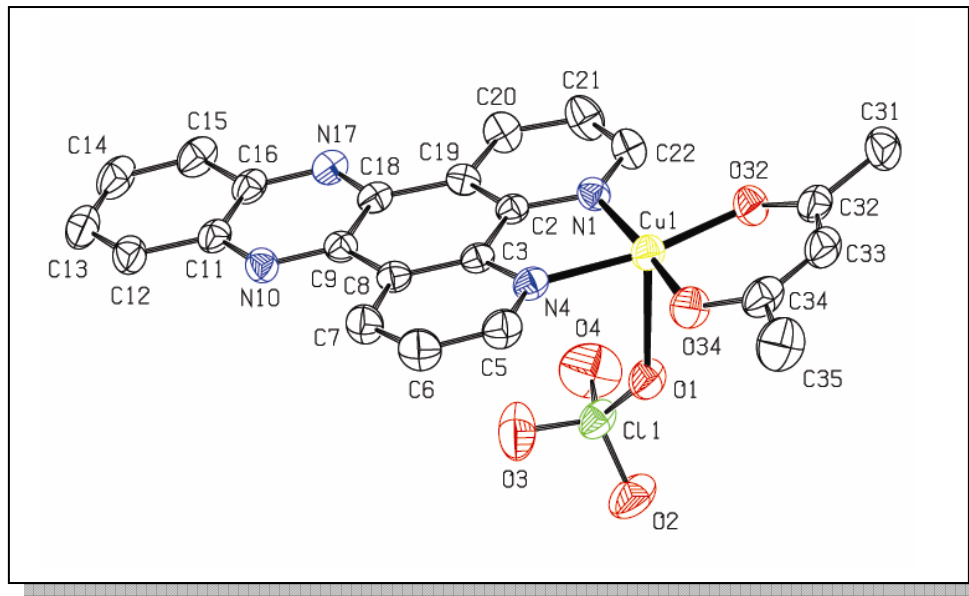


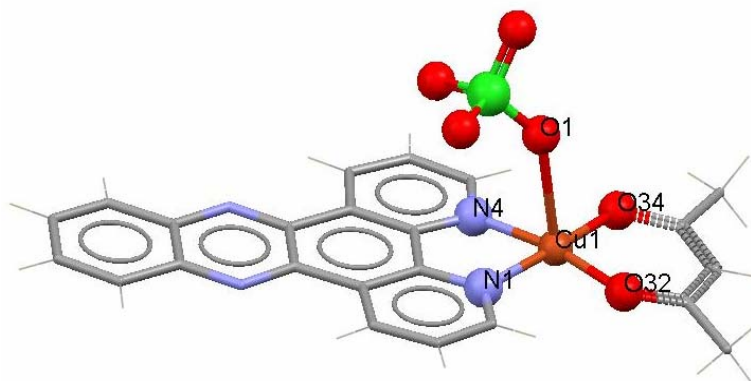
Figura 21: Estrutura cristalina ORTEP resolvida do complexo [Cu(acac)dppz](ClO₄)

No complexo **2** o íon Cu(II) está em um ambiente de coordenação piramidal de base quadrada ($\tau = 0,08$), que pode ser descrito como 4+1, onde o metal está coordenado por 2 átomos de nitrogênio do ligante dppz, com distância média de ligação de 2,006 Å, e por dois átomos de oxigênio do ligante acac com comprimento médio Cu-O de 1,902 Å. A esfera de coordenação é completada com a presença de um átomo de oxigênio do ânion perclorato, o qual ocupa uma posição apical estando 2,506 Å distante do centro metálico. Cabe destacar que a unidade $[\text{Cu}(\text{acac})(\text{dppz})]^+$ é essencialmente planar, sendo esta característica importante para o fenômeno de intercalação em biomoléculas.

Na Tabela 3, abaixo, estão apresentados os dados cristalográficos relevantes para o complexo **2**.

Tabela 3. Comprimentos (Å) e ângulos ($^{\circ}$) de ligação para o complexo $[\text{Cu}(\text{acac})(\text{dppz})](\text{ClO}_4)$

Cu1-O34	1,897(3)
Cu1-O32	1,906(2)
Cu1-N1	1,996(3)
Cu1-N4	2,016(3)
Cu1-O1	2,506(2)
O34-Cu1-O32	94,53(11)
O34-Cu1-N1	174,55(11)
O32-Cu1-N1	90,17(11)
O34-Cu1-N4	93,00(11)
O32-Cu1-N4	170,25(11)
N1-Cu1-N4	82,03(11)
O34-Cu1-O1	94,89(10)
O32-Cu1-O1	100,41(10)
N1-Cu1-O1	86,96(9)
N4-Cu1-O1	85,08(10)



4.4 – Ensaios de fluorescência

Ensaio realizado com o complexo 1 - [Cu(bpma)dppz](ClO₄)₂·0,67H₂O

Durante a absorção de radiação eletromagnética UV/Vis, as moléculas são elevadas a um estado eletrônico excitado (S_1 ou S_2). A maioria das moléculas dissipa este excesso de energia na forma de calor. Algumas, no entanto, emitem parte deste excesso energético como luz em um comprimento de onda diferente daquele correspondente à radiação absorvida. Quando a luz emitida pelo decaimento para o estado eletrônico fundamental (S_0) é proveniente de uma transição entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade ($S_1 \rightarrow S_0$), ou seja, permitidas pela regra da conservação do spin, tem-se o fenômeno da fluorescência.³⁸ Durante o tempo de vida do estado excitado, porém, uma variedade de interações químicas e físicas pode ocorrer antes da emissão, alterando as características espectrais do composto fluorescente. Estas alterações espectrais podem ser usadas no desenvolvimento de sondas para o DNA, uma vez que ocorra a afinidade deste aos complexos estudados.³⁴

Os ensaios de fluorescência em solução de CH₃CN demonstraram a atividade fluorescente do complexo 1 nos comprimentos de onda de excitação de 415nm e 470nm (Figura 24). O comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) de emissão para cada λ de excitação foi de 503nm e 520nm. A atividade fluorescente se deve principalmente à presença do heterociclo aromático planar “dppz”, que possui uma estrutura “rígida”, mantendo a multiplicidade de spin. Entretanto, a perspectiva do uso do complexo 1 como sonda fluorescente para o DNA fica limitada, já que o complexo possui baixos valores de intensidade de fluorescência, comparando-se com outras sondas como o Hoechst 33258 que possui altos valores de emissão.³⁵ Diante disto, conforme será demonstrado abaixo, o estudo de interação do complexo 1 com o DNA foi feito via titulação espectrofotométrica com base na diminuição da absorvância da transição intra-ligante $\pi-\pi^*$ centrada em 270 nm.

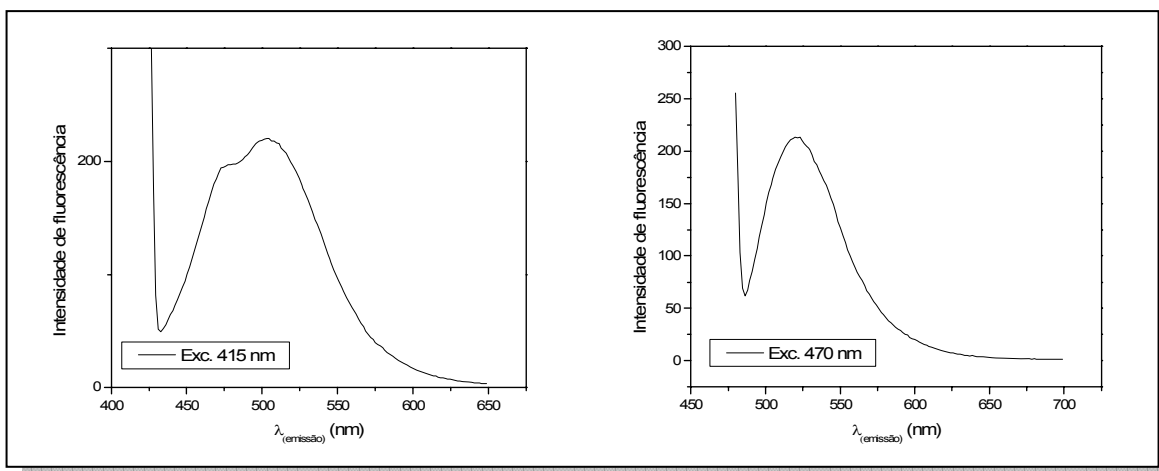


Figura 22 – Espectros de fluorescência do complexo **1** em CH₃CN. Comprimentos de onda de excitação de: a) 415 nm e b) 470 nm.

4.5 – Titulação espectrofotométrica com o DNA

Foram efetuadas titulações espectrofotométricas com o CT-DNA na faixa de 200 a 800 nm. Este estudo tem por objetivo verificar se o composto interage com o DNA de uma maneira intercalativa uma vez que drogas intercalativas à hélice do DNA têm sido caracterizadas através da titulação espectrofotométrica.³⁶

Os testes foram realizados da seguinte maneira:

Para o complexo **1**: [Cu(bpma)dppz](ClO₄)₂·0,67H₂O foi diluído em CH₃CN:H₂O (1:3), utilizando-se o tampão TRIS pH 7,23 com NaCl [200mM] e temperatura de 22°C. A concentração do complexo foi de 100 µM em um volume de 250 µL. Foram feitas adições sucessivas de 50 µL de CT-DNA [199,33 µM].

Para o complexo **2**: [Cu(acac)dppz](ClO₄) foi diluído em DMF:H₂O (1:3), utilizando-se o tampão TRIS pH 7,23 com NaCl [200mM] e temperatura de 22°C. A concentração do complexo foi de 100 µM em um volume de 250µL. Foram feitas adições sucessivas de 20 µL de CT-DNA [610 µM].

Nas Figuras 23 e 24 são ilustradas as variações nos espectros eletrônicos dos compostos [Cu(bpma)dppz](ClO₄)₂·0,67H₂O (**1**) e [Cu(acac)dppz](ClO₄) (**2**) na

presença de DNA. O espectro inicial (em preto) corresponde ao complexo livre (na ausência de DNA), enquanto que as demais curvas foram coletadas após adições sucessivas de CT-DNA à solução de complexo.

A análise de dados da titulação permite o cálculo da constante de ligação intrínseca (K_b) entre o complexo e o DNA, utilizando-se de um gráfico de $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_F) \times [DNA]$. A constante de ligação intrínseca mede a força de ligação do complexo ao DNA e nos permite comparar quantitativamente complexos entre si e com o intercalador clássico, brometo de etídio.³⁷

Calcula-se o K_b através da equação 1:³⁸

$$[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_F) = [DNA]/(\epsilon_B - \epsilon_F) + 1/K_b(\epsilon_B - \epsilon_F)$$

Nesta equação ϵ_F , ϵ_A e ϵ_B correspondem respectivamente ao coeficiente de extinção molar para o complexo metálico livre, ao coeficiente de extinção para cada adição de DNA e ao coeficiente de extinção para o complexo totalmente ligado.

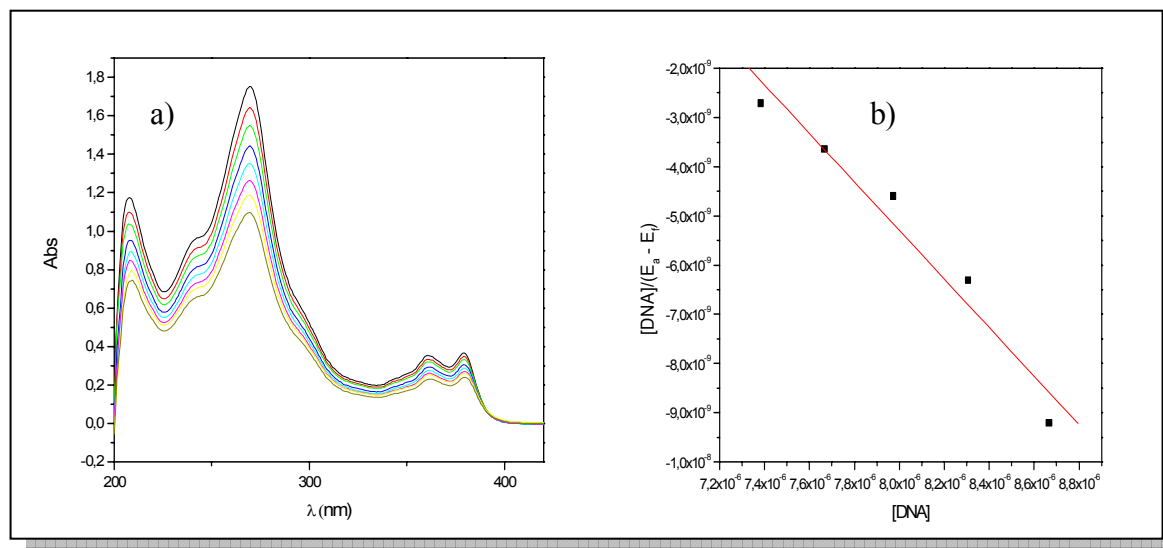


Figura 23: **a)** Espectro eletrônico do complexo **1** (100 μ M) na ausência (em preto) e na presença de quantidades equivalentes de CT-DNA. Solvente $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:3); pH 7,23 – TRIS com NaCl[200mM], 22°C. **b)** Gráfico de $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_F) \times [DNA]$ referentes à titulação espectrofotométrica do complexo **1** nas condições citadas. Ajuste linear: $R = 0,97761$. Comprimento de onda para acompanhar a interação: 270 nm.

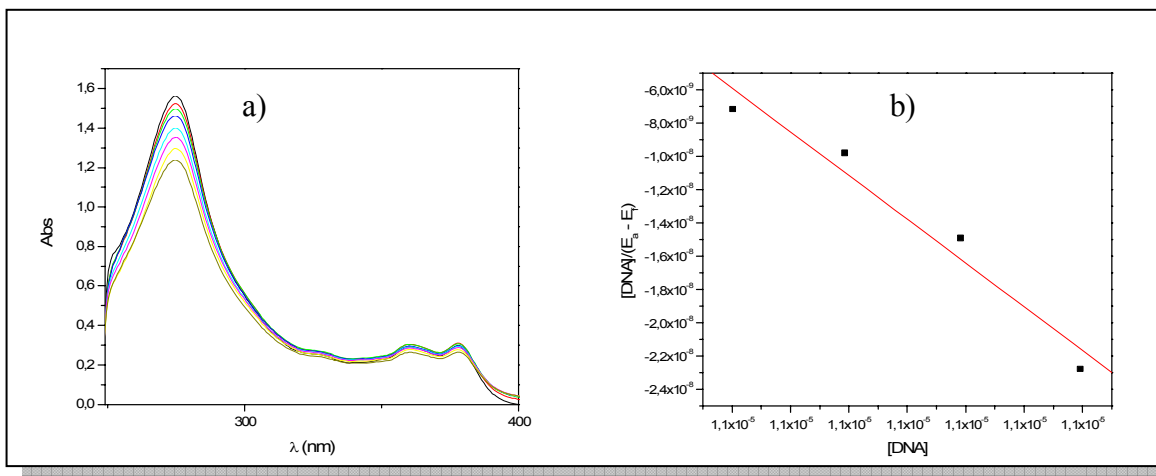


Figura 24: **a)** Espectro eletrônico do complexo **2** (100 μM) na ausência (em preto) e na presença de quantidades equivalentes de CT-DNA. Solvente DMF:H₂O (1:3); pH 7,23 – TRIS com NaCl[200mM], 22°C. **b)** Gráfico de $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F) \times [\text{DNA}]$ referentes à titulação espectrofotométrica do complexo **2** nas condições citadas. Ajuste linear: $R = 0,97901$. Comprimento de onda selecionado para acompanhar a força de interação: 275 nm.

Observa-se nas Figuras 23 e 24 que a adição de DNA à solução contendo os complexos **1** e **2** provoca um hipocromismo nas bandas dos espectros à medida que quantidades equivalentes de CT-DNA são adicionadas, e sem alteração nos valores de λ_{max} .

Complexos metálicos que se ligam ao DNA através de intercalação geralmente resultam em hipocromismo devido ao modo intercalativo envolvendo uma forte interação de empilhamento entre o cromóforo aromático e os pares de base do DNA.³⁹ A intensidade do hipocromismo é comumente consistente com a afinidade da interação de intercalação.^{39,40}

Através das titulações espectrofotométricas determinou-se o valor de K_b para os complexos **1** e **2** como sendo de $1,44 \cdot 10^5$ e $9,55 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ respectivamente. Estes valores são inferiores ao intercalador clássico que é o brometo de etídio (Tabela 4) que possui uma forte interação com moléculas de DNA e com os complexos são geralmente comparados. Entretanto os valores de K_b encontrados são maiores comparando-se com os valores tabelados de outros complexos

similares citados na literatura, o que mostra que as interações dos complexos sintetizados com o DNA são relativamente fortes.

Na Tabela 4 comparam-se diferentes complexos citados na literatura com características metalintercalativas e os respectivos valores de K_b .

Tabela 4 - Valores de K_b para o brometo de etídio e diferentes complexos metálicos.

Centro metálico	$K_b (M^{-1})$	Referência
Brometo de etídio	$7,0 \cdot 10^7$	37
Ru^{2+}	$5,12 \cdot 10^4 - 1,3 \cdot 10^5$	22
Cu^{2+}	$2,0 \cdot 10^4$	25
Cu^{2+}	$3,6 \cdot 10^4$	23
Cu^{2+}	$8,1 \cdot 10^4$	23
Cu^{2+}	$5,8 \cdot 10^4$	23
Cu^{2+}	$3,8 \cdot 10^4$	23
Cu^{2+}	$9 \cdot 10^5 - 9,6 \cdot 10^6$	41
Cu^+	$0,6 - 9,7 \cdot 10^4$	36
Complexo 1	$1,44 \cdot 10^5$	-
Complexo 2	$9,55 \cdot 10^4$	-

5 – Conclusões

Foram sintetizados a partir dos respectivos ligantes dois novos complexos de cobre(II): $[Cu(bpma)dppz](ClO_4)_2 \cdot 0,67H_2O$ (**1**) e $[Cu(acac)dppz](ClO_4)$ (**2**), os quais foram devidamente caracterizados por espectroscopia no infravermelho, UV-Vis e por difratometria de raios X.

O complexo **1**, mostrou pequena atividade fluorescente em dois comprimentos de onda de excitação distintos, entretanto a perspectiva de aplicação como sonda fluorescente para o DNA fica limitada devido aos baixos valores de intensidade.

Os complexos **1** e **2** apresentaram valores de K_b na ordem de $1,44 \cdot 10^5$ e $9,55 \cdot 10^4 M^{-1}$, valores superiores a complexos similares citados na literatura, o que demonstra excelente afinidade destes compostos com o DNA, abrindo-se a perspectiva de outros estudos de interação e degradação com o DNA.

6 – Referências Bibliográficas

- 1 – HÖRNER, R., **Estudo de Compostos Capazes de Clivar o DNA**. Florianópolis: UFSC, 2003, Tese de Doutorado.
- 2 – SADLER, P. J. Inorganic Chemistry and drug design. **Advances in Inorganic Chemistry**, v.36, p 1-48, 1991.
- 3 – WATSON, J.D., CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. **Nature**, v. 171, p. 737-738, 1953.
- 4 – GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. 2^a ed. :Thomson Brooks/Cole, Belmont, 1999. 851 p.
- 5 – BLACKBURN, G. M.; GAIT, M. J. **Nucleic acids in Chemistry and Biology**. 2^a ed. New York: Oxford University Press, 1997. 528 p.
- 6 – KRAMER, R. Bioinorganic models for the catalytic cooperation of metal ions and functional groups in nuclease and peptidase enzymes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 182, n. 1, p. 243-261, 1999.
- 7 – HOLM, R. H.; SOLOMON, E. I. Bioinorganic enzymology – Preface. **Chemical Reviews**, v. 7, p. 2237, 1996.
- 8 - ERKKILA, K. E.; ODOM, D. T.; BARTON, J. K. Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA. **Chemical Reviews**, v.99, n.9, p.2777- 2795. 1999.
- 9 - FERGUSON L, DENNY W. The genetic toxicology of acridines. **Mutation Research**, n. 258, p. 123–60. 1991.
- 10 - JEFFREY A. DNA modification by chemical carcinogens. **Pharmacology & Therapeutics**, n. 28, p. 237–72. 1985.
- 11 - STEPHENS T, BUNDE C, FILLMORE B. Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. **Biochemical Pharmacology**, n. 59, p. 1489–99. 2000.
- 12 - O'DONOGHUE, K.; PENEDO, J. C.; KELLY, J. M.; KRUGER, P. E. Photophysical study of a family of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Mendpq})]^{2+}$ complexes in different solvents and DNA: a specific water effect promoted by methyl substitution. **Dalton Transactions**, n.6, p.1123-1128. 2005.

13 – LIPPARD, S. J. Platinum complexes: probes of polynucleotide structure and antitumor drugs. **Accounts of Chemical Research**, v. 11, p. 211-217.1978.

14 – LIPPARD, S, J, et al. Stereochemical requirements for intercalation of platinum complexes into double-stranded DNA's. **Science**, v. 194, no. 4266, p. 726-728.1976.

15 – BARTON, J. K.; DANNENBERG, J. J.; RAPHAEL, A. L. Enantiomeric selectivity in binding tris(phenantroline)zinc (II) to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p.4967, 1982.

16 - GUO, L. H.; WEI, M. Y.; CHEN, H. Multiple DNA Binding Modes of a Metallointercalator Revealed by DNA Film Voltammetry. **Journal of Physical Chemistry B**, v.110, n.41, p.20568-20571. 2006.

17 - BRAÑA M, CACHO M, GRADILLAS A, DE PASCUAL-TERESA B, RAMOS A. Intercalators as anticancer drugs. **Current Pharmaceutic Design**, v. 7, p. 1745–80. 2001.

18- SIGMAN, D. S. Chemical nucleases. **Biochemistry**, v. 29, p. 9097-9105, 1990.

19 – TERENCE, H.; ALZARI, P. M.; ZAKIN M. M. Structural features involved in the formation complex between the monomeric or the dimeric form of the Rev-erb β DNA-binding domain and its RNA reactive sites. **Biochemistry**, v. 37, n.33, p. 11488-11495, 1998.

20 - DICKESON, J. E.; SUMMERS, L. A. Derivatives of 1,10-phenanthroline-5,6- quinone. **Australian Journal of Chemistry**, v.23, n.5, p.1023-1027. 1970.

21 - STOEFFLER, H. D.; THORNTON, N. B.; TEMKIN, S. L.; SCHANZE, K. S. Unusual Photophysics of a Rhenium(I) Dipyrrophenazine Complex in Homogenous Solution and Bound to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v.117, n.27, Jul 12, p.7119-7128. 1995.

22 - BARNARD, P. J.; VAGG, R. S. A spectroscopic investigation of the self association and DNA binding properties of a series of ternary ruthenium(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.99, n.5, p.1009-1017. 2005.

23 – NAVARRO, M.; CISNEROS-FAJARDO, E.J.; SIERRALTA A.; FERNANDEZ- MESTRE, M.; ARRIECHE, P. S. D.; MARCHÁN, E. Design of copper DNA intercalators with leishmanicidal activity. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, n. 8, p. 401–408. 2003.

24 - HE, X.-F.; WANG, L.; CHEN, H.; XU, L.; JI, L.-N. Synthesis, characterization and DNA binding study of Co(III) polypyridyl mixed-ligand complexes. **Polyhedron**, v.17, n.18, p.3161-3166. 1998.

25 - T. GUPTA, S. DHAR, M. NETHAJI AND A. R. CHAKRAVARTY, Bis(dipyridophenazine)copper(II) complex as major groove directing synthetic hydrolase, **Dalton Transactions**, n. 12, p. 1896. 2004.

26 - HOLMLIN, R. E.; STEMP, E. D. A.; BARTON, J. K. $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ Luminescence: Dependence on DNA Sequences and Groove-Binding Agents. **Inorganic Chemistry**, v.37, n.1, p.29-34. 1998.

27 - FRIEDMAN, A. E.; CHAMBRON, J. C.; SAUVAGE, J. P.; TURRO, N. J.; BARTON, J. K. A molecular light switch for DNA: $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})^{2+}$. **Journal of the American Chemical Society**, v.112, n.12, p.4960-4962. 1990.

28- I. HAQ, P. LINCOLN, D. SUH, B. NORDEN, B. Z. CHOWDHRY AND J. B. CHAIRES. Interaction of .DELTA.- and .LAMBDA.- $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DPPZ}]^{2+}$ with DNA: A Calorimetric and Equilibrium Binding Study. **Journal of the American Chemical Society**, n.117, p. 4788. 1995.

29 - PERALTA, R. A. Novos complexos binucleares de cobre(II) e de Ferro(III) zinco(II): biomiméticos sintéticos para catecol oxidase e para fosfatases ácidas púrpuras. **Tese de doutorado**, Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005, 266p.

30 - PAW, W.; EISENBERG, R. Synthesis, Characterization, and Spectroscopy of Dipyridocatecholate Complexes of Platinum. **Inorganic Chemistry**, v.36, n.11, p.2287-2293. 1997.

31 - HATHAWAY, B. J., BILLING, D. E. The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper(II) ion. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 5, p. 143-207, 1970.

32 - LEVER, A. B. P. **Inorganic Electronic Spectroscopy**, 2^a ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1984, p. 553-572.

33 - ADDISON, A. W., et.al. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of cooper(II) compounds containing nitrogen-sulfur donor ligands: the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II)perchlorate. **Journal Chemical Society, Dalton Transactions**, p.1349-1346, 1984.

34 - LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum, 1983. 496p.

35 - HARD, T.; FAN, P.; KEARNS, D. R. A fluorescence study of the binding of Hoechst 33258 and DAPI to halogenated DNAs. **Photochemistry and Photobiology**, vol. 51, p. 77-86, 1990.

36 - MAHADEVAN, S.; PALANIANDAVAR, M. Spectroscopic and voltammetric studies on copper complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolines bound to calf thymus DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 693-700, 1998.

37 - WARING, M. J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p. 269-282, 1965.

38 - PYLE, A. M., REHMANN, J. P., MESHOYRER, R., KUMAR, C. V., TURRO, N. J., BARTON, J. K., Mixed-ligand complexes of ruthenium (II): factors governing binding to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 3051-3058, 1989.

39 - LIU, J. et al. DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 91, p. 269-276, 2002.

40 - NIKOLIS, N.; METHENITIS, C.; PNEUMATIKAKIS, G. Studies on the interaction of altromycin B and its platinum(II) and palladium(II) metal complexes with calf thymus DNA and nucleotides. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 95, n. 2-3, p. 177-193, 2003.

41 - LIU, C. et al. DNA damage by copper (II) complexes: coordination - structural dependence of reactivities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 75, p. 233-240, 1999.